

Aus der Klinik und Poliklinik
für Haut- und Geschlechtskrankheiten
der Freien Universität Berlin im Klinikum Steglitz
Direktor: Prof. Dr. med. Hans Wolfgang Spier †

Intralymphovasculäre Infusion
 ^3H - und ^{14}C -radiomarkierter
Substanzen beim Meerschweinchen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Axel Henke
aus Berlin

1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Klinik und Poliklinik
für Haut- und Geschlechtskrankheiten
der Freien Universität Berlin im Klinikum Steglitz
Direktor: Prof. Dr. med. Hans Wolfgang Spier †

Intralymphovasculäre Infusion
 ^3H - und ^{14}C -radiomarkierter
Substanzen beim Meerschweinchen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Axel Henke
aus Berlin

Referent: Professor Dr. med. Franz K l a s c h k a

Korreferent: Professor Dr. med. Elmar S t ö c k e r



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 7. Mai 1976

I. EINLEITUNG

II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. MATERIAL

1. Versuchstiere
2. Adjuvantien
3. Radiomarkierte Lösungen
 - a) ^3H -Tracer
 - b) ^{14}C -Tracer

B. METHODIK

1. Operationstechnik
 - a) Technische Ausrüstung
 - b) Narkose
 - c) Darstellung der Lymphgefäße
 - d) Infusionstechnik
2. Versuchstiergruppen
3. Entnahme und Verarbeitung der Organe
 - a) Gravimetrische Messung
 - b) Aktivitätsmessung

III. ERGEBNISSE

A. AKTIVITÄT IN GEWEBEN UND KÖRPERFLÜSSIGKEITEN

1. Nach intrakutaner Applikation
(Versuchstier-Gruppe 1)
2. Nach intralymphovasculärer Applikation
(Versuchstier-Gruppe 2 bis 5)

B. ORGANGEWICHTSSTUDIEN

1. Einfluß von Freundschem Adjuvans
auf das Lymphknotengewicht
2. Organgröße und Aktivitätsspeicherung

IV. DISKUSSION

V. ZUSAMMENFASSUNG

VI. LITERATURHINWEISE

I. EINLEITUNG

Bei der Aufklärung der Pathogenese des allergischen Kontakt-
ekzems gilt das besondere Interesse dem Weg, den das Aller-
gen vom epidermalen Applikationsort bis hin zum ersten re-
aktiven Zentrum der Immunantwort, den regionären Lymph-
knoten (LK), zurücklegt. Nach klassischen Versuchen von
FREY und WENK (5, 6) war das Vorhandensein intakter regio-
närer Lymphknoten im Bereich der einen Allergen-Applika-
tionsort drainierenden Lymphgefäße (LG) unabdingbare Vor-
aussetzung für die Ekzemsensibilisierung.

Es lag nun nahe, das Allergen unmittelbar in den LK zu ap-
plizieren. Entsprechende Versuche von FREY und GELEICK (4)
führten aber wider Erwarten nicht zur Sensibilisierung.
MACHER und SENNLAUB (20) berichteten kurz darauf, daß sie
durch intralymphonoduläre (i.l.n.) DNCB (= 1 Chlor-2,4
dinitrobenzol)-Injektion beim Meerschweinchen (MS) eine
Sensibilisierung erzielen konnten. Ihre Methodik des Sen-
sibilisierungsnachweises ist jedoch nicht unwidersprochen
geblieben (13). Die unmittelbare i.l.n. Hapten-Zufuhr er-
weist sich jedenfalls nicht als besonders erfolgreicher Sen-
sibilisierungsweg.

In Übereinstimmung mit Versuchsergebnissen von WITTEN und
MARCH (32) konnten THIES, SCHWARZ und PALME (28) am MS nach
epikutaner Applikation von radioaktiv markiertem DNCB auto-
radiographisch im regionären LK bemerkenswerterweise auch
dann keine Aktivität nachweisen, wenn sie hohe Dosen bzw.
Konzentrationen von ^3H -DNCB anwendeten. Nach intracutaner
(i.c.) Applikation von ^{14}C -DNCB in minimalen, aber zur Sen-
sibilisierung ausreichenden Dosen fanden MACHER und CHASE
(19) im regionären LK des MS überraschenderweise allenfalls
Spuren radioaktiven Materials, von der 3. Stunde an waren
die LK des Einstromgebietes stets frei von Radioaktivität,
kontralaterale LK und Milz speicherten nie Aktivität.
MACHER (18) deutete diese Befunde in Übereinstimmung mit
den Ergebnissen von FREY und WENK (5, 6). Die Verarbeitung

des antigenen Reizes erfolgt demnach zwar im regionären LK und in anderen lymphatischen Organen, doch wird das Antigen zunächst von immunologisch kompetenten Zellen, wie Blutlymphozyten oder Makrophagen, die ständig in der Peripherie patrouillieren, aufgenommen und diese Information dann in den LK weitergetragen. In diesem Sinne hatte MEDAWAR (22) 1958 bereits das Konzept der "peripheren Sensibilisierung" formuliert.

Der Weg des Allergens wird bei intralymphovaskulärer (i.l.v.) Zufuhr weithin überschaubar. Nach i.l.v. Infusion von DNCB, das nachweislich den LK erreichte, kam es in Meerschweinchenversuchen zu einer Sensibilisierung (30). Allerdings waren die zur Sensibilisierung auf i.l.v. Wege angewendeten Allergendosen vergleichsweise höher als die bei perilymphovaskulärer Applikation bereits wirksamen. Sie lagen jedoch niedriger als die bei i.l.n. Zufuhr angewendeten Dosen (13, 14).

In den folgenden Untersuchungen stellten wir uns die Frage, wieviel des i.l.v. zugeführten Allergens im LK nachzuweisen ist. Als Allergen diente ^{14}C -markiertes DNCB, für Vergleichsstudien ^3H -Thymidin. Durch i.l.v. DNCB-Applikation wird die percutane Haptenresorption umgangen. Das Allergen kann in den mit Freund'schem Adjuvans vorbehandelten ipsi- und kontralateralen LK, in der Milz und im Blutserum durch Radioaktivitätsmessung quantitativ nachgewiesen werden.

II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. MATERIAL

1. Versuchstiere (VT) waren männliche und weibliche Albino-MS mit einem Gewicht zwischen 280 und 600 g bei Versuchsbeginn. Die VT lebten vor und während der Versuche unter konstanten Bedingungen (13) in Boxen und wurden mit Trockenfutter (Altromin^R) ernährt.

2. Adjuvantien

Zur Stimulierung des immunologisch-lymphatischen Apparates der LK erhielten die VT in der Regel 7 bis 15 Tage (minimal 4, maximal 45 Tage) vor der Allergen- bzw. Tracer-Infusion subkutane Injektionen von komplettem Freundschem Adjuvans (Fa. Difco-Laboratories, Detroit, USA) in beide Hinterläufe (s. Tab. 1, Seite 11).

3. Radiomarkierte Lösungen

Als Tracer wurden folgende ^3H - oder ^{14}C -markierte Lösungen bzw. Suspensionen verwendet:

- a) ^3H -Tracer

Lösung 1: ^3H -Thymidin (spezifische Aktivität 2,0 c/mMol) wurde in physiologischer NaCl-Lösung gelöst, so daß die Aktivitätskonzentration 2 $\mu\text{c}/0,1\text{ ml}$ betrug. (1 μc = 1 Mikro-Curie = $2,2 \cdot 10^6$ Zerfälle/min).

Lösung 2: ^3H -Thymidin-MS-Blutzell-Suspension:

Heparinisiertes MS-Blut wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen, der Zellsatz (80 Mio. Zellen) in 0,1 ml NaCl-Lösung und 0,1 ml ^3H -Thymidin-NaCl (spezifische Aktivität 2,0 c/mMol) aufgenommen, so daß eine Aktivitätskonzentration in der ^3H -Thymidin-Zell-suspension von 1 $\mu\text{c}/0,1\text{ ml}$ resultierte.

b) ^{14}C -Tracer

Lösung 3: ^{14}C -DNCEB

Es wurden 0,1 ml einer 0,1%igen acetonischen ^{14}C -DNCEB-Lösung (spezifische Aktivität 10,1 mc/mMol) in 0,3 ml physiologischer NaCl-Lösung unter Hinzugabe von 0,1 ml Tween 20^R gelöst. Diese Lösung hatte die Aktivitätskonzentration 10 µc/ml bzw. die Konzentration 0,2 mg DNCEB/ml. Tween 20^R wie auch Tween 80^R (Atlas-Chemie GmbH, Essen) wurden als Lösungsvermittler und zur Herabsetzung der Toxizität von alkoholischen bzw. Aceton-DNCEB-Lösungen benutzt.

Lösung 4: ^{14}C -DNCEB

Es wurden 0,2 ml einer 0,1%igen acetonischen ^{14}C -DNCEB-Lösung (spezifische Aktivität 9,9 mc/mMol) in 0,6 ml physiologischer NaCl-Lösung unter Hinzugabe von 0,2 ml Tween 80^R gelöst. Es entstand eine Lösung mit der Aktivitätskonzentration 9,8 µc/ml bzw. der Konzentration 0,2 mg DNCEB/ml.

B. METHODIK

1. Operationstechnik

a) Technische Ausrüstung

Die Tiere wurden bei Versuchsbeginn auf einem verstellbaren Operationstisch mittels Klemmvorrichtung an den Extremitäten fixiert. Ein Auflichtmikroskop mit seitlich von oben einfallendem Licht war erforderlich zur Gefäßpräparation und anschließenden Kontrolle der Infusion von Lösungen bzw. Suspensionen (s. Seite 7) in die LG. Mittels Glaskapillaren, die an einem Mikromanipulator (Fa. Zeiss, Wetzlar) befestigt wurden, erfolgte die i.l.v. Infusion (s. Seite 10). Durch Ausziehen von Weichglasröhrchen über einer kleinen Flamme waren diese Infusionskapillaren hergestellt worden. Nach derselben Methode ausgezogene PVC-Schläuche dienten als Verbindung zwischen Glaskapillare und Injektionsspritze.

Zum Operationsbesteck gehörten verschiedene Scheren, Pinzetten, Klemmen, Spritzen und Injektionskanülen sowie MICHEL -Klammern und -Zangen.

b) Narkose

Nach einer Rasur an den Hinterläufen und im Inguinalbereich erhielten die VT zur Narkose zuerst Nembutal^R (Fa. Deutsche Abbot GmbH, Ingelheim am Rhein) in der Dosierung von 12 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Kurz darauf wurde Ketanest^R (Fa. Parke Davis & Co., München) in Dosen von 80 mg/kg Körpergewicht intramuskulär in einen Vorderlauf injiziert. Nachdem Muskelentspannung, Schlaf und Areflexie beim Kneiftest eingetreten waren, wurden die MS auf dem Operationstisch in Rückenlage befestigt. Während der Operation wurden die Tiere vor Unterkühlung geschützt.

c) Darstellung der Lymphgefäße

Nach Injektion von Patentblau V^R 2,5% (Fa. Byk-Gulden, Konstanz) in die Fußsohle und blauer Anfärbung der regionären LG erfolgte deren sorgfältige Freilegung in kranialer Richtung, ausgehend von einem Schnitt ca. 1 cm distal der Zitze. Nach Umklappen des lateralen Dreieckklappens erwiesen sich im kutan-subkutanen Bindegewebe fixierte LG für die spätere Infusion besser geeignet als jene, die neben der Muskulatur lagen und pulsierenden großen Gefäßen direkt benachbart waren. Bei ihnen bestand während der Manipulationen stets die Gefahr der Verletzung der Blutgefäße mit starker Blutung. Ein Freipräparieren des LG von der Faszie war schließlich Voraussetzung für das Einführen der Kapillarspitze.

d) Infusionstechnik ¹⁾

Mit Hilfe des Mikromanipulators ließ sich die mit den radioaktiven Lösungen beschickte Kapillare vorsichtig in das dargestellte LG einstechen. Nach Kontrolle der intravasalen Lage durch feinste Seitenbewegung der Kapillarspitze wurde die Lösung in das LG gedrückt, wobei man im Auflichtmikroskop im Falle der ³H-Thymidin-Zellsuspension ein Strömen der einzelnen Erythrozyten beobachten konnte. Die Menge des eingeflossenen Materials ließ sich durch Messung bzw. Berechnung der aus der Kapillare abgeflossenen Menge recht genau bestimmen. Nach Retraktion der Glaskapillarspitze aus dem LG kam es nur selten zum sichtbaren Rückfluß eingebrachter Lösungsreste aus dem Einstichloch. Die Haut wurde im Operationsgebiet mit MICHEL-Klammern geklammert. Die Tiere kamen wieder in ihre Boxen.

¹⁾ Herrn Prof. Dr. med. M. W i e d e r h o l t sei an dieser Stelle für seine Unterstützung bei der Durchführung der Infusionsversuche gedankt.

2. Versuchstiergruppen

Einen Überblick über die bei verschiedenen Tiergruppen durchgeführten Untersuchungen gibt Tab. 1
Tabelle 1 Zusammensetzung und Versuchsprogramm der VT-Gruppen 1 bis 5

	VT - Gruppe 1	VT - Gruppe 2	VT - Gruppe 3	VT - Gruppe 4	VT - Gruppe 5
Anzahl der VT	20	14	6	6	12
Vorbehand- lung mit Freundschem Adjuvans	10 VT : 0,03ml 10 VT : $\emptyset$	9 VT : 0,2 ml 5 VT : 0,3 ml	0,2 ml	0,3 ml	0,1 ml
Art des Versuches	i.c. Injektion	i.l.v. Infusion	i.l.v. Infusion	i.l.v. Infusion	i.l.v. Infusion
markierte Lösung	14 C-DNCB (Lösung 3)	3 H-Thymidin (Lösung 1)	3 H-Thymidin-Blut- zellen (Lösung 2)	14 C-DNCB (Lösung 3)	14 C-DNCB (Lösung 4)
Tötung post injec- tionem	4 VT - 6h 4 VT - 24h 6 VT - 72h 6 VT - 144h	4 VT - 12h ¹⁾ 4 VT - 24h 3 VT - 72h 3 VT - 144h	2 VT - 24 h 3 VT - 72 h 1 VT - 144 h	2 VT - 24 h 2 VT - 72 h 2 VT - 144 h	4 VT - 24 h 3 VT - 72 h 5 VT - 144 h
Aktivitäts- messung in	Urin, LK, Haut, Serum Milz, Serum	LK, Milz, Serum	LK, Milz, Serum	LK, OP-Feld, Milz, Serum	LK, Milz, Vollblut, Serum

1) 10 min bis 12 h postoperativ eingegangen.

3. Entnahme und Verarbeitung der Organe

a) Gravimetrische Messung

Die VT wurden durch Decapitation getötet. Unter Vermeidung von Kompression während des Ausblutens ließ sich genügend Vollblut für die Aktivitätsmessung gewinnen. Anschließend wurden die Organe herauspräpariert und nach sorgfältiger Entfernung von Fettgewebe und Faszien auf einer Analysenwaage gewogen. Mittels Spezialboxen konnten bei Tieren der VT-Gruppe 1 Urinportionen separat vom 1., 2. und 3. Versuchstag aufgefangen werden.

b) Aktivitätsmessung

Organe bzw. Hautexzisate von Tieren der VT-Gruppe 1 wurden im ganzen oder in Teilen mit 1,0 ml 20% NaOH versetzt. Von dieser Lösung wurden 0,2 ml in eine Szintillationsflüssigkeit gegeben. Diese Flüssigkeit setzt sich wie folgt zusammen: 8,0 ml Scintillator-Toluol (16 g PPO ¹⁾ + 0,2 g PoPop ²⁾ pro 4 l Toluol) + 5,0 ml absoluter Alkohol + 2,5 ml Amylalkohol + 3,0 ml Formamid. Gewebe der VT-Gruppen 2, 3 und 4 wurden ebenfalls mit 2,0 ml 20% NaOH versetzt, wovon hier jeweils nur 0,1 ml in die Szintillationsflüssigkeit geleitet wurden.

In einem Tri-Carb Sample Oxidizer (Modell 305, Fa. Packard Instrument Company, USA) wurden ganze Organe oder Organteile der VT-Gruppe 5 vollständig verbrannt, das Produkt eingeleitet in eine Szintillationsflüssigkeit, die aus einer Lösung von PermablendTM III^R (25 mg) (Fa. Packard Instrument Company, USA) in Toluol (2 l)

1) PPO = 2,5-Diphenyloxazol

2) PoPop= 1,4 Bis [2-(4-methyl-5-phenyl)oxazolyl] benzol

und Methanol (1 l) bestand. Gezählt wurde in Glaszählöpfchen.

Vom Vollblut der Tiere der VT-Gruppe 5 wurden 0,2 ml mit 1,5 ml Soluene-100^R/ Isopropanol (1:1) im Plastikzählöpfchen vermischt (Soluene-100^R: Fa. Packard Instrument Company, USA). Nach Hinzufügen von 0,5 ml 30 bis 35%igem H₂O₂ und leichter Erwärmung erfolgte Zugabe von 15 ml eines Gemisches HCl (0,5 n)/Insta-Gel^R (1:9) (Insta-Gel^R: Fa. Packard Instrument Company, USA).

Das Blut der Tiere aus den VT-Gruppen 1, 2, 3 und 4 wurde zentrifugiert, 0,2 ml Serum 1:1 mit 20% NaOH versetzt, davon 0,1 ml einpipettiert in 8,0 ml eines Scintillator-Toluol-Triton-Gemisches (2 Teile Scintillator-Toluol zu 1 Teil Triton X-100) und 0,4 ml 20% HClO₄ zugegeben. Bei den Tieren der Gruppe 5 mischten wir für die Aktivitätsmessung 0,2 ml Serum im Verhältnis 1:9 mit Insta-Gel^R.

Aktivitätsbestimmungen im Urin erfolgten bei 6 VT der Gruppe 1, die mit Freundschem Adjuvans vorbehandelt worden waren. Der Sammelurin wurde pro Portion mit destilliertem Wasser auf 30 ml aufgefüllt, davon 0,1 ml zur Zählung einpipettiert in 8,0 ml eines Scintillator-Toluol-Triton-Gemisches, nachdem noch 0,4 ml 20%ige HClO₄ zur Lösung des Ausfalls zugefügt worden waren.

Gezählt wurde die Radioaktivität in allen Versuchen in einem Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer (Modell 3380, Fa. Packard Instrument Company, USA). Das Gerät mißt Radioaktivität in "counts" für eine bestimmte Zeiteinheit. Von Bedeutung waren für uns alle Aktivitätswerte, die in den "counts" ihrer absoluten Aktivität mindestens doppelt so groß waren wie der jeweilige Leerwert.

Durch die vielfältigen Aufbereitungsmethoden der Organe und Körperflüssigkeiten bedingt, waren die Zählausbeute und die Bestimmungsgrenze für ^{14}C -DNCE innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen jeweils verschieden. Tabelle 2 gibt für jene Werte einen Überblick.

Tabelle 2

Zählausbeute und Bestimmungsgrenze für ^{14}C -DNCE

VT - Gruppe	Zählausbeute in %			Bestimmungsgrenze für ^{14}C -DNCE in ng		
	Organe bzw. Haut- exzisate	Serum bzw. Voll- blut	Urin (ver- dünnt)	Organe bzw. Haut- exzisate	Serum bzw. Voll- blut	Urin (verdünnt)
1	66	85	79	2,55	0,71/0,1ml	0,35/0,1
2 u. 3	31	31	-			
4	83	83	-	9,1	1,4/0,2ml	-
5	40	50 bis 70	-	0,91	0,34/0,2ml	-

Angegeben sind alle Zahlenwerte in
"disintegrations per minute" (= dpm).

Es gilt die Beziehung: $\text{dpm} = \frac{\text{cpm}}{\text{Zählausbeute}}$

cpm = counts per minute

III. ERGEBNISSE

A. Aktivität in Geweben und Körperflüssigkeiten

1. Nach intrakutaner Applikation (VT-Gruppe 1)

In den ipsilateralen LK (s. Tab. 3) ließ sich bei 4 von 4 VT, von denen 2 mit Freundschem Adjuvans vorbehandelt waren, 6 Stunden post injectionem (p.i.) 0,05 bis 0,2°/oo der applizierten Gesamtaktivität wiederfinden. Nach 6 Stunden waren die LK frei von Aktivität.

Die kontralateralen LK speicherten zu keinem Zeitpunkt Aktivität, unabhängig davon, ob die VT mit Freundschem Adjuvans zuvor behandelt worden waren oder nicht.

In der Haut über dem Injektionsgebiet fand man bei VT der 6-Stunden-Gruppe in relativ großen Streubreiten Speicherwerte zwischen 4,6 und 128°/oo. 24 Stunden p.i. lagen die Werte zwischen 3,7 und 87°/oo, und 72 Stunden p.i. betrugen sie minimal 0,8°/oo und maximal 82°/oo. Nach 144 Stunden war die Aktivität auf Werte von 3,1 bis 49°/oo der applizierten Gesamtaktivität gesunken.

Keine Radioaktivität ließ sich in der Milz nachweisen.

Im Serum wurde Aktivität 12 und 24 Stunden p.i. gefunden, danach nicht mehr. Die 24-Stunden-Werte lagen ca. 37% unter den 6-Stunden-Werten von durchschnittlich 270 dpm/0,1ml Serum.

Fast die Hälfte (345 bis 491°/oo) der applizierten Gesamt-Aktivität wurde in den ersten 24 Stunden im Urin ausgeschieden. 22 bis 31°/oo ließen sich im Sammelurin der 24. bis 48. Stunde und 8°/oo im Urin der 48. bis 72. Stunde nachweisen (s. Tab. 3 b).

Tabelle 3

VT-Gruppe 1 Aktivität (i.c. Injektion von 50 µg ^{14}C -DNCEB $\hat{=}$ $5,5 \cdot 10^6$ cpm)

VT-Nr.	Freund-sches Adj.	Tö-tung p.i.	LK ipsilateral dpm · 10 ³ / LK	o/oo d.Einf.	LK kontralat. dpm · 10 ³ / LK	Haut dpm · 10 ³ / Hautexzizat	o/oo d.Einf.	Milz dpm/Milz	Serum dpm/o,1 ml
1	Ø	6h	0,8	0,15	0	25,4	4,6	0	345
2	Ø	6h	0,3	0,05	0	-	-	0	278
3	+	6h	0,3	0,05	0	703	128	0	243
4	+	6h	1,1	0,2	0	480	87	0	219
5	+	24h	0	0	0	480	87	0	168
6	+	24h	0	0	0	20,3	3,7	0	175
7	Ø	24h	0	0	0	83,5	15	0	184
8	Ø	24h	0	0	0	141	26	0	153
9	Ø	72h	0	0	0	235	43	0	0
10	Ø	72h	0	0	0	248	45	0	0
11	Ø	72h	0	0	0	4,5	0,8	0	0
12	+	72h	0	0	0	235	43	0	0
13	+	72h	0	0	0	287	52	0	0
14	+	72h	-	-	0	452	82	0	0
15	+	144h	0	0	0	87,4	16	0	0
16	+	144h	0	0	0	149	27	0	0
17	+	144h	0	0	0	98,9	18	0	0
18	Ø	144h	0	0	0	16,8	3,1	0	0
19	Ø	144h	0	0	0	63,9	12	0	0
20	Ø	144h	0	0	0	271	49	0	0

Tabelle 3 b

VT-Gruppe 1 Aktivität im Urin (i.c. Injektion von $50 \mu\text{g } ^{14}\text{C-DNCB} \hat{=} 5,5 \cdot 10^6 \text{ cpm}$)

Vt-Nr.	Freund-sches Adj.	Stoffwechsel-zeitraum	dpm $\cdot 10^6 / 30 \text{ ml}$ Urinverdünnung	%o d. Einf.
1	Ø		-	-
2	Ø		-	-
3	+		-	-
4	+		-	-
5	+	0 - 24 h	2,3	418
6	+	0 - 24 h	2,7	491
7	Ø		-	-
8	Ø		-	-
9	Ø		-	-
10	Ø		-	-
11	Ø		-	-
12	+	24 - 48 h	0,17	31
13	+	24 - 48 h	0,12	22
14	+	24 - 48 h	0,17	31
15	+	48 - 72 h	0,045	8
16	+	48 - 72 h	0,044	8
17	+	0 - 24 h	1,9	345
18	Ø		-	-
19	Ø		-	-
20	Ø		-	-

2. Nach intralymphovaskulärer Applikation

a) VT-Gruppe 2

4 VT dieser aus insgesamt 14 Tieren bestehenden VT-Gruppe (vgl. Tab. 1, Seite 11) waren innerhalb von 10 min bis 12 Stunden postoperativ gestorben. Ihre Organe wurden jedoch für die Untersuchungen herangezogen. Im ipsilateralen LK fand sich dabei eine Aktivität von 9,6 bis zu 22,6⁰/oo der applizierten Gesamtaktivität (s. Tab. 4).

Bei VT, die 24 Stunden p.i. getötet wurden, ließen sich im ipsilateralen LK 21 bis 23⁰/oo der Gesamtaktivität nachweisen. 72 Stunden p.i. lagen die Werte zwischen 12 und 16⁰/oo, und 144 Stunden p.i. fand man noch Werte zwischen 3 und 7⁰/oo der Gesamtaktivität.

Zwei von 4 VT der 24 Stunden postoperativ untersuchten Tiere, bei denen es intraoperativ zur Läsion des LG gekommen war, zeigten abweichende Einzelwerte (s. Tab. 4).

Im kontralateralen LK konnte in keinem Fall eine Aktivität nachgewiesen werden.

Die Speicherwerte in der Milz lagen nach 12 Stunden zwischen 17 und 71⁰/oo. Nach 24 Stunden wurden Werte von 11 und 15⁰/oo gefunden, die 72-Stunden-Werte zeigten breite Streuung und lagen zwischen 6 und 28⁰/oo, die 144-Stunden-Werte zwischen 12 und 19⁰/oo der applizierten Gesamtaktivität.

Im Blutserum konnte mit der herangezogenen Methodik keine Aktivität nachgewiesen werden.

Tabelle 4
VT-Gruppe 2 Aktivität (i.l.v. Infusion ^3H -Thymidin in NaCl, min. $528 \cdot 10^3$ cpm; max. $1144 \cdot 10^3$ cpm)

VT Nr.	Zeit p.i.	LK ipsilateral		LK kontralat.	Milz		Serum
		$\text{dpm} \cdot 10^3 / \text{LK}$	$\text{O} / \text{OO d.GA}$	$\text{dpm} \cdot 10^3 / \text{LK}$	$\text{dpm} \cdot 10^3 / \text{Milz}$	$\text{O} / \text{OO d.GA}$	
1	10 min	18,9	22,6	0	0	0	-
2	90 min	13,1	11,5	0	81,5	71,2	-
3	90 min	0	0	0	10,6	20,0	-
4 (1)	12 h	6,4	9,6	0	11,3	17,0	-
5	24 h	21,4	21,1	0	11,6	11,5	-
6 (2)	24 h	0	0	0	0	0	0
7 (1)	24 h	0	0	0	0	0	-
8	24 h	23,9	23,7	0	15,2	15,0	-
9	72 h	9,6	14,5	0	11,9	18,0	0
10	72 h	11,6	12,6	0	5,6	6,1	0
11	72 h	17,2	16,3	0	30,4	28,8	0
12	144 h	6,8	7,1	0	18,4	19,1	0
13	144 h	4,8	5,7	0	0	0	-
14	144 h	3,1	3,0	0	13,1	12,4	0

GA = Gesamtaktivität

(1) = LG-Läsion während der Operation

(2) = Wahrscheinliche Läsion des LG

b) VT-Gruppe 3

Nach i.l.v. ^3H -Thymidin-Blutzell-Infusion fand sich 24 Stunden p.i. 9 bis $15^0/00$ der Gesamtaktivität im ipsilateralen LK wieder (s. Tab. 5). 72 Stunden p.i. lagen die Werte zwischen 10 und $20^0/00$. Nach 144 Stunden war keine Aktivität mehr vorhanden.

Der kontralaterale LK war 24 Stunden, 72 Stunden und 144 Stunden nach der Infusion frei von Aktivität.

Nach 24 Stunden ließ sich in der Milz keine Radioaktivität nachweisen. Bei zwei von 3 VT betrugen die Speicherwerte nach 72 Stunden 21 und $29^0/00$. Nach 144 Stunden p.i. war die Milz frei von Radioaktivität.

Im Serum war weder nach 72 noch nach 144 Stunden Aktivität nachzuweisen.

c) VT-Gruppe 4

24 Stunden nach i.l.v. Infusion von ^{14}C -DNCE fand man im ipsilateralen LK aktives Material zwischen 6 und $24^0/00$ der Applikationsdosis (s. Tab. 6). 72 Stunden p.i. ließ sich bei 1 von 2 VT noch $12^0/00$ nachweisen, 144 Stunden p.i. war der ipsilaterale LK frei von Aktivität.

Im kontralateralen LK fand sich keine Aktivität.

Das OP-Feld der ipsi- und kontralateralen Seite war stets frei von Aktivität.

In Milz und Blutserum war zu keiner Zeit eine Aktivität nachzuweisen.

d) VT-Gruppe 5

Nach i.l.v. Applikation von ^{14}C -DNCB konnten im ipsilateralen LK nach 24 Stunden 2 bis $26^0/\text{oo}$ der Gesamtaktivität gefunden werden (s. Tab. 7). Nach 72 Stunden fanden sich 1 bis $7^0/\text{oo}$ und nach 144 Stunden nur noch ca. 0,7 bis $0,9^0/\text{oo}$.

Bei 1 von 4 VT ließ sich nach 24 Stunden im kontralateralen LK Aktivität von $2^0/\text{oo}$ der applizierten Gesamtdosis nachweisen, alle anderen Meßwerte waren negativ.

Milz und Vollblut bzw. Serum waren stets frei von Aktivität.

Tabelle 5

VT-Gruppe 3 Aktivität (i.l.v. Infusion ^3H -Thymidin-Blutzellen; min. $5,6 \cdot 10^6$ Zellen, $308 \cdot 10^3$ cpm;
max. $10,0 \cdot 10^6$ Zellen, $550 \cdot 10^3$ cpm)

VT Nr.	Zeit p.i.	LK ipsilateral		LK kontralat.		Milz		Serum
		$\text{dpm} \cdot 10^3 / \text{LK}$	$^{\circ}/_{\infty}$ d.GA	$\text{dpm} \cdot 10^3 / \text{LK}$	$\text{dpm} \cdot 10^3 / \text{Milz}$	$^{\circ}/_{\infty}$ d.GA	$\text{dpm}/0,1 \text{ ml}$	
1 ⁽¹⁾	24 h	2,9	9,6	0	0	0	-	-
2	24 h	8,4	15,2	0	0	0	-	-
3	72 h	8,6	20,7	0	12,5	29,9	0	0
4 ⁽¹⁾	72 h	5,5	16,7	0	7,2	21,6	0	0
5	72 h	5,2	10,8	0	0	0	-	-
6	144 h	0	0	0	0	0	0	0

GA = Gesamtaktivität

(1) = LG-Läsion während der Operation

Tabelle 6

VT-Gruppe 4 Aktivität (i.l.v. Infusion min. 4,52 µg ^{14}C -DNCB = $497 \cdot 10^3$ cpm;
max. 5,04 µg ^{14}C -DNCB = $554 \cdot 10^3$ cpm)

VT Nr.	Zeit p.i.	LK ipsilateral		LK kontralat.		OP-Feld ipsilat.		OP-Feld kontralat.		Milz		Serum	
		$\text{dpm} \cdot 10^3 / \text{LK}$	o/oo d.GA	dpm / LK	dpm	dpm	dpm	dpm	$\text{dpm} \cdot 10^3 / \text{Milz}$	$\text{dpm} / \text{o,2 ml}$			
1	24h	13,4	24,2	o	o	o	-	-	o	o		o	
2	24h	3,1	5,9	o	o	o	o	o	o	o		o	
3	72h	6,3	12,4	o	o	o	o	o	o	o		o	
4	72h	o	o	o	o	o	-	-	o	o		o	
5	144h	o	o	o	o	o	o	-	o	o		o	
6	144h	o	o	o	o	o	o	-	o	o		o	

GA = Gesamtaktivität

(1) = LG-Läsion während der Operation

Tabelle 7

VT-Gruppe 5 Aktivität (i.l.v. Infusion min. 2,2 μ g 14 C-DNCB = 237.10³cpm; max. 4,8 μ g 14 C-DNCB = 517.10³cpm)

VT Nr.	Zeit p.i.	LK ipsilateral		LK kontralateral		Milz	Vollblut	Serum
		dpm.10 ³ /LK	o/oo d.GA	dpm.10 ³ /LK	o/oo d.GA			
1	24 h	9,5	26,0	0	0	0	0	-
2	24 h	1,4	4,9	0	0	0	0	-
3	24 h	0,9	2,7	0,7	2,0	0	0	-
4	24 h	0	0	0	0	0	0	-
5	72 h	4,0	7,7	0	0	0	0	0
6	72 h	0,8	1,8	0	0	0	0	0
7	72 h	0,3	1,1	0	0	0	0	0
8	144 h	0,4	0,9	0	0	0	0	-
9	144 h	0,3	0,7	0	0	0	0	-
10	144 h	0,3	0,9	0	0	0	0	-
11	144 h	0	0	0	0	0	0	-
12	144 h	0	0	0	0	0	0	-

GA = Gesamtaktivität

(1) = Kontrolltier, ohne Infusion

(2) = Narbenbildung im LG

(3) = LG-Läsion während der Operation

B. ORGANGEWICHTSSTUDIEN

1. Einfluß von Freundschem Adjuvans auf das Lymphknotengewicht

10 Tiere der VT-Gruppe 1 waren 6 Tage vor Versuchsbeginn mit komplettem Freundschem Adjuvans vorbehandelt worden (s. Tab. 1, Seite 11). Man registrierte bei den 6, 24 und 72 Stunden nach Versuchsbeginn entnommenen regionären Knie- bzw. Leisten-LK eine Gewichtszunahme um das dreifache gegenüber LK nicht vorbehandelter, gleich großer VT, bei den 144 Stunden im Versuch gewesenen VT sogar das vierfache (s. Tab. 3 a). Die Lymphknoten nicht vorbehandelter Tiere zeigten durchweg konstante Gewichte um 80 mg.

2. Organgröße und Aktivitätsspeicherung

Eine Übersicht über die Organgewichte von LK bzw. Milz und die in diesen Geweben nachgewiesene Gesamtaktivität für die VT-Gruppen 1 bis 5 geben Tab. 3 a bis 7 a. Es ist zusätzlich die Aktivität pro mg Feuchtgewicht aufgeführt. Man findet innerhalb der Tierreihen gleichen Versuchszeitraumes keine direkte Proportionalität von Organgewichten und Aktivität. Es bestehen vielmehr große Aktivitätsschwankungen in bezug auf mg Feuchtgewicht.

Tabelle 3 a

VT-Gruppe 1 Organ-Gewichte (i.c. Injektion ^{14}C -DNCEB)

VT Nr.	Freund- sches Adj.	Tötung p.i.	LK ipsilateral		LK kontralateral	
			LK-Gewicht (mg)	dpm · 10 ³ /LK	LK-Gewicht (mg)	dpm · 10 ³ /LK
1	Ø	6 h	40	0,8	50	0
2	Ø	6 h	110	0,3	80	0
3	+	6 h	160	0,3	210	0
4	+	6 h	300	1,1	190	0
5	+	24 h	80	0	110	0
6	+	24 h	160	0	230	0
7	Ø	24 h	20	0	50	0
8	Ø	24 h	60	0	80	0
9	Ø	72 h	110	0	110	0
10	Ø	72 h	120	0	80	0
11	Ø	72 h	70	0	60	0
12	+	72 h	380	0	190	0
13	+	72 h	180	0	250	0
14	+	72 h	260	-	250	0
15	+	144 h	225	0	120	0
16	+	144 h	490	0	400	0
17	+	144 h	330	0	370	0
18	Ø	144 h	70	0	70	0
19	Ø	144 h	45	0	20	0
20	Ø	144 h	160	0	95	0

FG = Feuchtgewicht

VT Nr.	L K i p s i l a t e r a l			M i l z		
	LK-Gewicht (mg)	dpm · 10 ³ /LK	dpm/mg FG	Gewicht (mg)	dpm · 10 ³ /Milz	dpm/mg FG
1	270	18,9	70,0	830	0	0
2	1210	13,1	10,8	1420	81,5	57,4
3	100	0	0	1420	10,6	7,4
4	740	6,4	8,6	1780	11,3	6,3
5	85	21,4	251	780	11,6	14,9
6	415	0	0	165	0	0
7	220	0	0	1470	0	0
8	490	23,9	48,9	1540	15,2	9,9
9	780	9,6	12,3	950	11,9	12,5
10	630	11,6	18,4	1010	5,6	5,5
11	190	17,2	90,5	1270	30,4	24,0
12	550	6,8	12,4	1400	18,4	13,2
13	400	4,8	11,9	2040	0	0
14	580	3,1	5,4	1490	13,1	8,8

FG = Feuchtgewicht

Tabelle 5 a

VT-Gruppe 3 Organ-Gewichte (i.l.v. Infusion ^3H -Thymidin-Blutzellen)

VT Nr.	L K i p s i l a t e r a l			M i l z		
	LK-Gewicht (mg)	dpm · 10 ³ /LK	dpm/mg FG	Gewicht (mg)	dpm · 10 ³ /Milz	dpm/mg FG
1	760	2,9	3,9	1390	0	0
2	1340	8,4	6,2	2190	0	0
3	380	8,6	22,8	1220	12,5	10,3
4	180	5,5	30,6	1090	7,2	6,6
5	1040	5,2	5,1	1750	0	0
6	250	0	0	760	0	0

FG = Feuchtgewicht

Tabelle 6 a

VT-Gruppe 4 Organ-Gewichte (i.l.v. Infusion $^{14}\text{C-DNCB}$)

VT	L K i p s i l a t e r a l		
	LK-Gewicht (mg)	dpm · 10 ³ /LK	dpm/mg FG
Nr.			
1	575	13,4	23,5
2	445	3,1	6,9
3	230	6,3	27,2
4	460	0	0
5	690	0	0
6	530	0	0

FG = Feuchtgewicht

Tabelle 7 a

VT-Gruppe 5 Organ-Gewichte (i.l.v. Infusion $^{14}\text{C-DNCB}$)

VT Nr.	L K i p s i l a t e r a l			L K k o n t r a l a t e r a l		
	LK-Gewicht (mg)	dpm · 10 ³ /LK	dpm/mg FG	LK-Gewicht (mg)	dpm · 10 ³ /LK	dpm/mg FG
1	1110	9,5	8,6	2040	0	0
2	725	1,4	1,9	30	0	0
3	1540	0,9	0,6	470	0,7	1,4
4	650	0	0	450	0	0
5	2230	4,0	1,8	1345	0	0
6	1100	0,8	0,7	1295	0	0
7	510	0,3	0,5	190	0	0
8	1515	0,4	0,2	620	0	0
9	620	0,3	0,5	845	0	0
10	1020	0,3	0,3	1140	0	0
11	1005	0	0	750	0	0
12	980	0	0	780	0	0

FG = Feuchtgewicht

IV. DISKUSSION

Durch Stimulation des immunologisch-lymphatischen Apparates der Organe des retikulo-endothelialen Systemes mit komplettem Freundschem Adjuvans sollte die operative LK-Darstellbarkeit verbessert und die Fähigkeit zur Aktivitätsspeicherung nach i.c. oder i.l.v. Applikation vergrößert werden. Das Freundschsche Adjuvans bildet ein Depot (12, 27) mit kontinuierlicher Reizwirkung auf die Immunzellen, so daß eine Sensibilisierung vom Spättyp gegen gleichzeitig applizierte Allergene verstärkt wird (10, 3). In unseren Versuchen zeigten die LK der vorbehandelten Tiere eine hochgradige Größenzunahme, die sich durch Gewichtsvermehrung bis zum vierfachen gegenüber LK von nicht mit komplettem Freundschem Adjuvans behandelten, gleich großen VT feststellen ließ (s. Tab. 3 a).

Im regionären Lymphabflußgebiet fanden sich zum Zeitpunkt der Präparation in der Regel 2, maximal 4 einzelne LK, die nur bei VT nach länger zurückliegender Injektion von Freundschem Adjuvans miteinander verbacken waren. Möglicherweise ist bei diesen VT die Aufnahmefähigkeit für markierte Substanzen in gewissen Grenzen verändert, und zwar in Abhängigkeit vom zeitlichen Intervall zwischen Adjuvans-Behandlung und Untersuchungstag.

Das Gewicht der LK unbehandelter und behandelter VT schwankte innerhalb weiter Grenzen, eine Tatsache, die MACHER (16) selbst bei unbehandelten Tieren einförmiger Versuchsreihen festgestellt hatte. Auch das Milzgewicht unserer VT zeigte große Streubreiten. Bei Betrachtung der Ergebnisse (Tab. 3 a bis 7 a) zeigt sich, daß nach i.c. bzw. i.l.v. Applikation markierter Substanzen in gewichtsvermehrten und in kleinen Organen, LK wie auch Milzen, unterschiedliche Mengen von radiomarkierten Substanzen gefunden werden können. Zwischen LK- bzw. Milzgewicht und festgehaltener Aktivität besteht offenbar keine feste Beziehung.

Mittels i.l.v. Infusion gelang die Zufuhr radioaktiv markierter Substanzen unmittelbar in die afferenten LG-Ab-schnitte von MS unter Umgehung der Hautpassage. Die zu diesem Zweck hergestellten ^{14}C -DNCB-Lösungen enthielten 0,02 % DNCB. Diese Konzentration reizt oder schädigt nach WANDER (30) die LG nicht. Die Allergenpassage zum regionären LK wird demnach nicht beeinträchtigt. Die Lösungen 1 bis 4 (s. S. 7) zeigten, gemessen an den eingebrachten Volumina, keine Unterschiede in bezug auf ihre Infundierbarkeit. Maximal konnten 26 μl infundiert werden. Unsere Infusionsmengen von 2,2 bis 5,04 μg ^{14}C -DNCB lagen unter den von WANDER (30) applizierten Dosen von $\geq 17 \mu\text{g}$, die für eine Sensibilisierung auf i.l.v. Wege notwendig waren.

Für die erheblichen Streubreiten der in LK und Milz nachgewiesenen Aktivität sind einige methodische Fehler zweifellos verantwortlich zu machen.

Konzentrationsveränderungen in Stammlösungen durch Verdunsten der Aceton-Lösungsmittel während einer mehrtägigen Lagerung dürften eine vergleichsweise geringe Rolle spielen. Auch Entmischungsvorgänge innerhalb der gefüllten Kapillaren, wie sie in erster Linie bei ^3H -Thymidin-Zellsuspensionen eintreten könnten, erscheinen zwar möglich, jedoch innerhalb der kurzen Infusionsdauer von geringer Bedeutung.

Geringe Verluste der infundierten Lösungen bei Retraktion der Kapillarspitze aus dem LG, wonach ein Rückfluß kleinster Volumina aus dem Einstichloch eintreten kann, wurden bei genauer Betrachtung des Operationssitus unter dem Auflichtmikroskop nur ganz vereinzelt beobachtet.

Die für einzelne VT-Gruppen nicht einheitliche Aufarbeitung der Organe und des Blutserums zur Aktivitätszählung und z.T. unterschiedlich lange Lagerung von Proben bis zur Messung könnten die Ergebnisse quantitativ beeinflusst haben (s. Tab. 2, Seite 14).

Nach i.l.v. ^3H -Thymidin- bzw. ^3H -Thymidin-Zell-Infusion wurde im ipsilateralen LK und in der Milz eine ca. dreimal höhere Radioaktivität nachgewiesen als nach i.l.v. ^{14}C -DNCB-Infusion. Das Nucleosid Thymidin ist Baustein der Desoxyribonucleinsäure(DNS)-Kette, welche sich bei jeder Zellteilung identisch redupliziert. Durch Vorbehandlung mit Freundschem Adjuvans befinden sich zumindest die LK am Fuß und in der Leistengegend im Zustand der Stimulation (s.o.), so daß das für die Teilungsvorgänge der lymphatischen Zellen benötigte Thymidin nach Erreichen des LK hier aufgenommen und höchstwahrscheinlich auch noch länger als 144 Stunden festgehalten wird. Die ^3H -Thymidin-Speicherung in LK vorher sensibilisierter VT wurde von OORT und TURK (25) beschrieben.

Über die LK gelangt das markierte Material, als solches oder gebunden an Zellen, in die Milz. Dort wird bemerkenswerterweise nach 72 und 144 Stunden eine höhere Aktivität als in den regionären LK gefunden. Bei Infusion roter Blutzellen homologer MS mit ^3H -Thymidin (Lösung 2) wird eine geringere Aktivitätsspeicherung in LK und Milz gefunden als bei Infusion der ^3H -Thymidin-NaCl-Lösung (Lösung 1).

Zur intrakutanen Injektion von ^{14}C -DNCB (VT-Gruppe 1) benutzten wir eine 10mal höhere Dosis als die von MACHER und CHASE (19) mit 5,0 μg angegebene Minimaldosis zur i.c. Sensibilisierung. Unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität der Lösung 3 und 4 von ca. 10 mc/mMol gegenüber der von MACHER und CHASE benutzten von 4,86 mc/mMol ergibt sich, daß in unserem Versuch der i.c. ^{14}C -DNCB-Injektion eine 20mal höhere Aktivität appliziert wurde, und zwar in die mit Freundschem Adjuvans vorbehandelten LK. So konnte im LK wie auch im Serum eine Aktivität gemessen werden. Auf Zusammenhänge zwischen minimaler Sensibilisierungsdosis, spezifischer Aktivität des Allergens und Speicherungsquote in Organen hatten GODFREY, BAER und WATKINS (9) hingewiesen. Andererseits waren diese "günstigen" Ausgangsbedingungen unserer Versuchsanordnung durch die höhere Bestimmungsgren-

ze für ^{14}C -DNCB (s. Tab. 2, Seite 14) gegenüber der bei MACHER und CHASE gültigen von nur 0,16 ng ^{14}C -DNCB wiederum eingeschränkt.

Während MACHER und CHASE (19) 1 Stunde nach i.c. Injektion von ^{14}C -DNCB 10 % und 12 Stunden darauf nur noch 1 % der applizierten Gesamtaktivität im Injektionsgebiet nachweisen konnten, fanden wir 6 Stunden p.i. maximal 12 %, 72 Stunden p.i. 4 bis 8 % und 144 Stunden p.i. sogar noch Werte von 4 % der Gesamtaktivität (s. Tab. 3). Höhere Quoten hatten GODFREY, BAER und WATKINS (9) bei epikutaner Applikation von ^3H -Pentadecylcatechol, einer aus Giftefeu isolierbaren Substanz, feststellen können. Die Serumaktivität von ^3H -Pentadecylcatechol (vgl. Tab. 8) wie auch die Aktivität im regionären LK erreichten in ihren Versuchen am 3. Tag ihr Maximum, unsere Werte zeigen bei Vergleich der 24-Stunden-Gruppe mit der 6-Stunden-Gruppe eine fallende Tendenz (s. Tab. 3). Diese Unterschiede könnten durch andersartige Applikation sowie die höhere Reagibilität des kleineren Moleküls DNCB bedingt sein.

Wie Tab. 3 b deutlich zeigt, wird in den ersten 24 Stunden fast die Hälfte der injizierten Gesamtaktivität im Urin ausgeschieden.

Im Gegensatz zu Befunden von MACHER und CHASE (19), die nach i.c. Applikation von ^{14}C -DNCB 30 Minuten p.i. nur 0,1 % der Gesamtaktivität im regionären LK und von der 3. Stunde an die LK stets frei von Aktivität fanden, gelang uns der Aktivitätsnachweis 6 Stunden nach i.c. Injektion mit Werten bis zu 0,2 % der Gesamtaktivität (s. Tab. 3). WITTEN und MARCH (32) hatten bei MS nach epikutaner Applikation von ^{14}C -DNCB im regionären LK ebenfalls Aktivität nachweisen können, desgleichen TURK (29) sowie FARKER und TURK (26) nach Auftragen einer ^{14}C -Dinitrofluorbenzol-Lösung auf die Haut des MS-Ohres. Letztere Autoren wiesen sogar im kontralateralen LK Aktivität nach, wenn auch höchstens in halb so großen Beträgen wie im regionären LK (26). TURK (29) erklärte diesen

Befund mit vielleicht bestehenden LG-Verbindungen über den Schädel des VT.

Nach i.l.v. ^{14}C -DNCB-Infusion mit mindestens 10fach niedrigeren Dosen als bei i.c. Applikation (VT-Gruppe 1) konnten wir Radioaktivität bis zu 144 Stunden p.i. im regionären, in einem Falle auch im kontralateralen LK, nie aber in der Milz, im OP-Feld und im Serum bzw. Vollblut nachweisen. Die 24-Stunden-Werte im regionären LK liegen eindeutig höher als Daten von Autoren, die allergene Substanzen epikutan (26, 9) oder subkutan (s. Tab. 8) applizierten. 72 Stunden p.i. (VT-Gruppe 5) ist trotz großer Streuung der Werte eine Abnahme der Aktivität zu registrieren, und nach 144 Stunden kann mit unserer Methodik bei 4 von 7 VT keine Radioaktivität nachgewiesen werden.

Die Speicherung des markierten Materials ist in Zusammenhang mit Sensibilisierungsvorgängen zu sehen. Nach Allergenkontakten reduziert sich vom 6. Tag an die Zellzahl des LK, nachdem seit dem 4. Tag massenhaft pyrininophile Zellen in den Rindenknoten aufgetreten waren (17). Vom 5. Tag nach Allergenapplikation kann das VT als sensibilisiert gelten (25). Der Aktivitätsabfall im LK mag folglich auch zusammenhängen mit der Abwanderung von lymphoiden Zellen (9).

Eine vergleichende Übersicht über einige der nach i.l.v. Infusion sowie i.c. Injektion von ^{14}C -DNCB gefundenen Ergebnisse gibt Tabelle 8. Durch Einordnung unserer Befunde in eine umgearbeitete und erweiterte Liste von NOSSAL und ADA (24) werden die in Versuchen verschiedener Autoren nachgewiesenen Organ- und Serumaktivitäten, angegeben in Prozent der applizierten Gesamtaktivität, zusammengefaßt.

Tabelle 8

Radioaktivität in Prozent der applizierten Gesamtaktivität

Antigen	Applikationsart	Dosis (µg)	VT	Zeit p.i. (Stunden)	Applikationsstelle	regionärer LK	Blutserum	Autoren
Pentadecylcatechol	epicutan	960	MS	24	53		0,3	GODFREY, BAER u. WATKINS (9)
Pentadecylcatechol	epicutan	960	MS	72	44		0,5	GODFREY, BAER u. WATKINS (9)
DNCB	i.c.	50	MS	6	ca. 8-12	ca. 0,1	0,8	eigene Befunde
DNCB	i.c.	50	MS	24	ca. 20	0	0,5	eigene Befunde
DNCB	i.c.	5,0	MS	24	0,8	0		MACHER u. CHASE (19)
Picrylchlorid	i.c.	0,25	MS	24	16	0		MACHER u. CHASE (19)
Hämocyanin	s.c.	20	Kaninchen	24	15	0,5		HUMPHREY u. FRANK (11)
Flagella	s.c.	1-2	Ratte	24	5	0,3		ADA u. WILLIAMS (2)
Flagellin	s.c.	1-2	Ratte	24	0,53	0,05		ADA u. LANG (1)
Serumalbumin (Mensch)	s.c.	10	Ratte	72	0,37	0,02		LANG u. ADA (15)
DNCB	i.l.v.	2,2-4,8	MS	24		0,3-2,6	-	eigene Befunde
DNCB	i.l.v.	2,2-4,8	MS	72		0,1-0,7	0	eigene Befunde

Die vorgelegten Untersuchungsbefunde unterstreichen, daß die regionären LK primäres Auffangorgan für Antigenreize sind. Der Abfluß von kutan appliziertem, löslichem Antigen erfolgt keineswegs ausschließlich über regionale Venen (19), und die immunologische Information gelangt nicht nur über den Blutkreislauf in Organe des lymphatischen Systems. Vielmehr sind mindestens zwei Wege nebeneinander für den Abtransport von Hapten aus der Peripherie anzunehmen (29, 7, 21):

1. Das kutan nicht oder wenig fixierte Hapten fließt direkt über die drainierenden LG in den regionären LK ab ("passive drainage", 8) und erreicht diesen vermutlich in konjugierter Form (26). Das - im einzelnen unbekannte - Carrier-Molekül ist wahrscheinlich ein Protein (31). Spätestens in den LK-Sinusoiden wird das Antigen dann von Makrophagen oder von phagozytierenden Randzellen (24) phagozytiert und kommt dann in Kontakt mit Lymphozyten, die für die Primärantwort im LK zuständig sind.
2. Das kutan fixierte, nicht lösliche Hapten wird von patrouillierenden, aus dem Blut stammenden Lymphozyten in der Peripherie als "fremd" erkannt, aufgenommen und in die regionären LK gebracht ("assisted drainage", 8). Hier vermehren sich die Lymphozyten und geben ihren Tochterzellen die immunologische Information weiter. Dieser Vorgang der "peripheren Sensibilisierung" ist bereits 1958 von MEDAWAR beschrieben worden (22, 23).

Wahrscheinlich kann bei jeder kutanen Allergen-Applikation der eine oder der andere Weg der Hapten-Drainage quantitativ überwiegen. Welcher Weg jeweils eingeschlagen wird, ob "passivedrainage" oder "assisted drainage", ist abhängig sowohl von physikalischen und chemischen Eigenschaften der Substanz, wie Molekülgröße, Reagibilität, Löslichkeit, elektrischer Ladung (24) und Metabolisierung, als auch von äußeren Faktoren, wie Beschaffenheit des Applikationsortes, aber auch Anwesenheit oder Abwesenheit von spezifischen Antikörpern und dergl..

Weitere Untersuchungen mit verfeinerten Methoden eines quantitativen Allergennachweises werden Aufschluß geben können über die am kontaktallergischen Sensibilisierungsablauf beteiligten Zellelemente und deren Funktionen beim Transport und bei der Verarbeitung der antigenen Informationen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Um die Aufnahme eines Ekzem-Allergens (1 Chlor-2,4 di-nitrobenzol) in die Lymphknoten des regionären Einstromgebietes zu prüfen, erhielten Meerschweinchen (MS), die z.T. mit Freundschem Adjuvans vorbehandelt waren, das ^{14}C -markierte DNCB intrakutan in den Hinterlauf injiziert (20 Versuchstiere) oder - mittels spezieller Operationstechnik - intralymphovascular in die afferenten Lymphgefäße der Leistengegend infundiert (18 Tiere). Ferner wurden zum Nachweis der Aktivitätsspeicherung im MS-Lymphknoten intralymphovascular Infusionen mit ^3H -Thymidin-Lösungen (14 Tiere) sowie mit ^3H -Thymidin-MS-Blutzell-Suspensionen durchgeführt. Bei der Aufarbeitung der Lymphknoten, insbesondere mit Gravimetrie und Aktivitätsmessung, ergaben sich folgende Befunde:

1. Bei den mit Freundschem Adjuvans vorbehandelten Versuchstieren fand sich gegenüber nicht vorbehandelten Vergleichstieren eine Zunahme des Lymphknotengewichtes auf das 3 - 4fache, allerdings mit erheblicher Streubreite. Zwischen Lymphknoten- bzw. Milzgewicht und Aktivitätsaufnahme bestand keine Korrelation.
2. Intrakutan mit ^{14}C -DNCB vorbehandelte MS zeigten eine rasche Abnahme der insgesamt nur in Spuren nachweisbaren Aktivität in den regionären Lymphknoten bis zur 6., im Serum bis zur 24. Stunde. Fast die Hälfte der applizierten Gesamtaktivität wurde innerhalb der ersten 24 Stunden im Urin ausgeschieden. Im kontralateralen Lymphknoten und in der Milz ließ sich zu keinem Zeitpunkt Radioaktivität nachweisen.
3. Nach intralymphovascularer ^{14}C -DNCB-Infusion wurde bei den 24, 72 und 144 Stunden post infusionem durchgeführten Messungen eine kontinuierliche Abnahme der nachweisbaren Radioaktivität in den regionären Lymphknoten festgestellt. Die OP-Felder, Milzen, Vollblut bzw. Serum sowie die kontralateralen Lymphknoten (mit einer Ausnahme)

waren zu allen Zeiten frei von Aktivität.

4. Bei intralymphovaskulärer Infusion von ^3H -Thymidin-Lösungen wie auch von ^3H -Thymidin-MS-Blutzell-Suspensionen konnten nach 24, 72 und 144 Stunden in den regionären Lymphknoten und in der Milz gespeicherte Aktivität gefunden werden. Diese war insgesamt höher als nach intralymphovaskulärer ^{14}C -DNCB-Applikation. Im kontralateralen Lymphknoten und Serum war auch hier zu keiner Zeit eine Aktivität nachzuweisen.

Diese Untersuchungsergebnisse bestätigen die Aufnahme peripher applizierter Ekzemallergene überwiegend im regionären Lymphknoten. Für den Transport der im Lymphknoteneinflußgebiet applizierten antigenen Information kommen in Einklang mit den Vorstellungen von FRIEDLAENDER und BAER (7) zumindest folgende Wege in Betracht:

1. direkte Allergendrainage über die afferenten Lymphgefäße
2. Allergenaufnahme in der Peripherie durch Lymphozyten mit nachfolgender Allergeneinbringung in den Lymphknoten ("periphere Sensibilisierung").

Um den Übertragungsmechanismus der an Zellmaterial gebundenen Allergen- bzw. Antigen-Information auf die Immunzellbildungszentren im regionären Lymphknoten weiter aufzuklären, könnte die angewendete intralymphovaskuläre Infusionsmethode hilfreich sein.

VI. LITERATURHINWEISE

- 1 ADA, G.L., and P.G. LANG: Antigen in tissues. II. State of antigen in lymph nodes of rats given isotopically labelled flagellin, hemocyanin or serum albumin. *Immunology*, 10, 431 (1966)
- 2 ADA, G.L., and J.M. WILLIAMS: Antigens in tissues. I. State of bacterial flagella in lymph nodes of rats injected with isotopically flagella. *Immunology*, 10, 417 (1966)
- 3 BURNET, F.M.: Körpereigene und körperfremde Substanzen bei Immunprozessen (Übers. von Horst, H., J. Preuer und R. Preuer), S. 204. Thieme, Stuttgart, 1973
- 4 FREY, J.R., und H. GELEICK: Intranodale (intralymphatische) Injektion von Dinitrobenzol und Kontaktekzem des Meerschweinchens. *Dermatologica (Basel)* 124, 321 (1962)
- 5 FREY, J.R., und P. WENK: Experimentelle Untersuchungen zur Pathogenese des Kontaktekzems. *Dermatologica (Basel)* 112, 256 (1956)
- 6 FREY, J.R., und P. WENK: Über die Funktion der regionalen Lymphknoten bei der Entstehung des Dinitrochlorbenzol-Kontaktekzems am Meerschweinchen. *Dermatologica (Basel)* 116, 243 (1958)
- 7 FRIEDLAENDER, M.H., and H. BAER: Immunologic tolerance: role of the regional lymph node. *Science*, 176, 312 (1972)
- 8 GODFREY, H.P., and H. BAER: The effect of excision of the site of application on the induction of delayed contact sensitivity. *J. Immunol.* 107, 1643 (1971)
- 9 GODFREY, H.P., H. BAER and R.C. WATKINS: Delayed Hypersensitivity to catechols. V. Absorption and distribution of substances related to poison ivy extracts and their relation to the induction of sensitization and tolerance. *J. Immunol.* 106, 91 (1971)
- 10 GÜNTHER, O.: Einführung in die Immunbiologie, 3. Aufl., S. 89. Hippokrates-Verlag, Stuttgart 1974
- 11 HUMPHREY, J.H., and M.M. FRANK: The localization of non-microbial antigens in the draining lymph nodes of tolerant, normal and primed rabbits. *Immunology*, 13, 87 (1967)
- 12 KABAT, E.A.: Einführung in die Immunchemie und Immunologie (Übers. von Jann, K., und E. Rüdé), S. 28. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1971

- 13 KLASCHKA, F.: Tierexperimentelle Studien zum Kontaktekzem. II. Histologie der epicutanen 2,4-Dinitrochlorbenzol-Hautreaktion bei "cutan" und "extracutan" sensibilisierten Meerschweinchen. Arch. klin. exp. Derm. 224, 216 (1966)
- 14 KLASCHKA, F., und St. WANDER: Intralympho-vasculäre 2,4-Dinitrochlorbenzol-Infusion im Meerschweinchen-Sensibilisierungsversuch. Hautarzt 23, 262 (1972)
- 15 LANG, P.G., and G.L. ADA: The localization of heat denatured serum albumin in rat lymph nodes. Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 45, 445 (1967)
- 16 MACHER, E.: Die Reaktion der regionären Lymphknoten beim tierexperimentellen allergischen Kontaktekzem. I. Mitteilung: Makroskopische Untersuchungen. Hautarzt, 13, 18 (1962)
- 17 - II. Mitteilung: Histologische Untersuchungen. Hautarzt, 13, 126 (1962)
- 18 MACHER, E.: Allergisches Kontaktekzem und Immuntoleranz. Experimentelle Befunde und klinische Implikationen. Hautarzt, 20, 145 (1969)
- 19 MACHER, E., and M.W. CHASE: Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. XI. The fate of labelled picryl chloride and dinitrochlorbenzene after sensitizing injections. J. exp. Med. 129, 81 (1969)
- 20 MACHER, E., und W. SENNLAUB: Über die Sensibilisierbarkeit von Meerschweinchen durch Applikation von Dinitrochlorbenzol in Lymphknoten oder Milz. Dermatologica (Basel) 126, 207 (1963)
- 21 McCLUSKEY, R.T., and P.D. LEBER: Lymph node changes in delayed sensitivity, in: Mechanism of cell mediated immunity, Ed.: McCluskey, R.T., and St. Cohen. John Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto, 1974
- 22 MEDAWAR, P.B.: The homograft reaction. Proc. roy. Soc. B 149, 145 (1958)
- 23 MEDAWAR, P.B.: Transplantation of tissues and organs. Introduction. Brit. med. Bull. 21, 97 (1965)
- 24 NOSSAL, G.J.V., and G.L. ADA: Antigens, lymphoid cells and the immune response, p. 39-59. Academic Press, New York and London, 1971
- 25 OORT, J., and J.L. TURK: A histological and autoradiographic study of lymph nodes during the development of contact sensitivity in guinea-pig. Brit. J. exp. Pathol. 46, 147 (1965)

- 26 PARKER, D., and J.L. TURK: DNP-conjugates in guinea-pig lymph nodes during contact sensitization. *Immunology* 18, 855 (1970)
- 27 SOHMURA, Y.: Studies on the adjuvant action of mineral oil and bacterial endotoxin. *Jap. J. Microbiol.* 16, 307 (1972)
- 28 THIES, W., E. SCHWARZ und G. PALME: Zur Pathogenese des Kontaktekzems. 1. Autoradiographische Verteilungsstudien beim Meerschweinchen nach epicutaner Applikation von ^3H -Dinitrochlorbenzol. *Arch. klin. exp. Derm.* 223, 558 (1965)
- 29 TURK, J.L.: Lymphocyte response to antigens. A. Afferent side of sensitization arc. Response of lymphocytes to antigens. *Transplantation* 5, 952 (1967)
- 30 WANDER, St.: Sensibilisierungsstudien mit 2,4-Dinitrochlorbenzol durch intralymphovaskuläre Infusion beim Meerschweinchen. Inaugural Dissertation, Berlin, 1971
- 31 WECK, A., DE, and J.R. FREY: Monographs in allergy, Vol. 1: Immuntolerance to simple chemicals, p.6. Karger, Basel und New York, 1966
- 32 WITTEN, V.H., and C.H. MARCH: Studies of the mechanism of allergic eczematous contact dermatitis. II. Use of ^{14}C -labelled 2 : 4 dinitrochlorbenzene in guinea pigs. *J. invest. Derm.* 31, 97 (1958)

An dieser Stelle möchte ich Herrn
Prof. Dr. med. F. K l a s c h k a
für die Überlassung des Themas
sowie für die laufende Beratung und
Betreuung sehr herzlich danken.

L e b e n s l a u f

Am 3.3. 1949 wurde ich in Berlin geboren als Sohn des Arztes Dr. Dr. med. Max Henke. Ich besuchte das humanistische Goethe-Gymnasium in Berlin-Wilmersdorf und bestand hier 1968 das Abitur.

Im April 1968 begann ich an der Freien Universität Berlin mit dem Studium der Humanmedizin, das ich ebendort mit der ärztlichen Prüfung am 28.2. 1974 abschloß. Nach zwölfmonatiger Medizinalassistentenzeit erhielt ich am 31.7. 1975 vom Senator für Gesundheit und Umweltschutz, Berlin, die Approbation. Seit August 1975 widmete ich mich der Fertigstellung der Dissertation in der Hautklinik des Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin.

